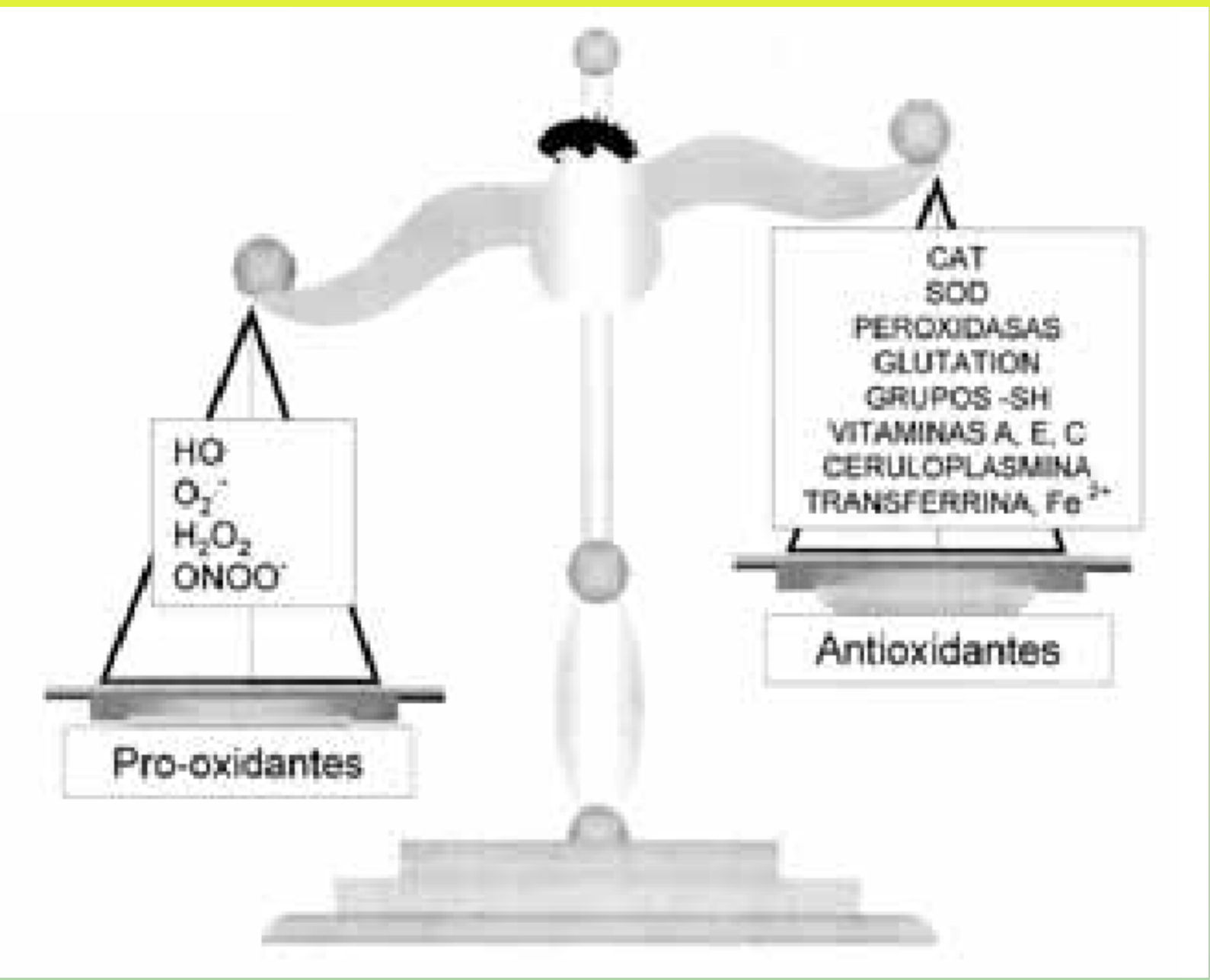




Trabajo de Fin de Grado: Métodos Analíticos para la Determinación de Antioxidantes en Muestras Biológicas

Autor: Huet Breña, Cristina.

Estrés Oxidativo



- Daño oxidativo:**
- Envejecimiento
 - Aterosclerosis
 - Cáncer
 - Cataratas
 - Cirrosis
 - Hipertensión
 - Insuficiencia renal
 - Diabetes
 - Neurodegenerativas: Alzheimer o Parkinson

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Antioxidantes: Moléculas capaces de captar el electrón desapareado del orbital externo de los radicales libres y de esta forma desactivarlos. Disminuyen el estrés oxidativo y actúan sobre el mismo inhibiéndolo, para evitar la oxidación de las proteínas, los lípidos y el ADN.

OBJETIVOS

- Cuantificar la capacidad antioxidantes de muestras biológicas
- Capacidad antioxidante total: método ORAC, TRAP, TEAC, FRAP.
 - Capacidad antioxidante específica: enzimáticos (SOD, GPx, GR, CAT) y no enzimáticos (Glutatión, vitamina C, vitamina E).

METODOLOGÍA

Revisión bibliográfica mediante diferentes bases de datos Google Académico, Science Direct, SciELO.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A) Métodos para medir la capacidad antioxidante total en muestras biológicas (IN VITRO)

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity o Capacidad de Absorción de Radicales de Oxigeno)

Fluorim trico

Azoderivado

AUC

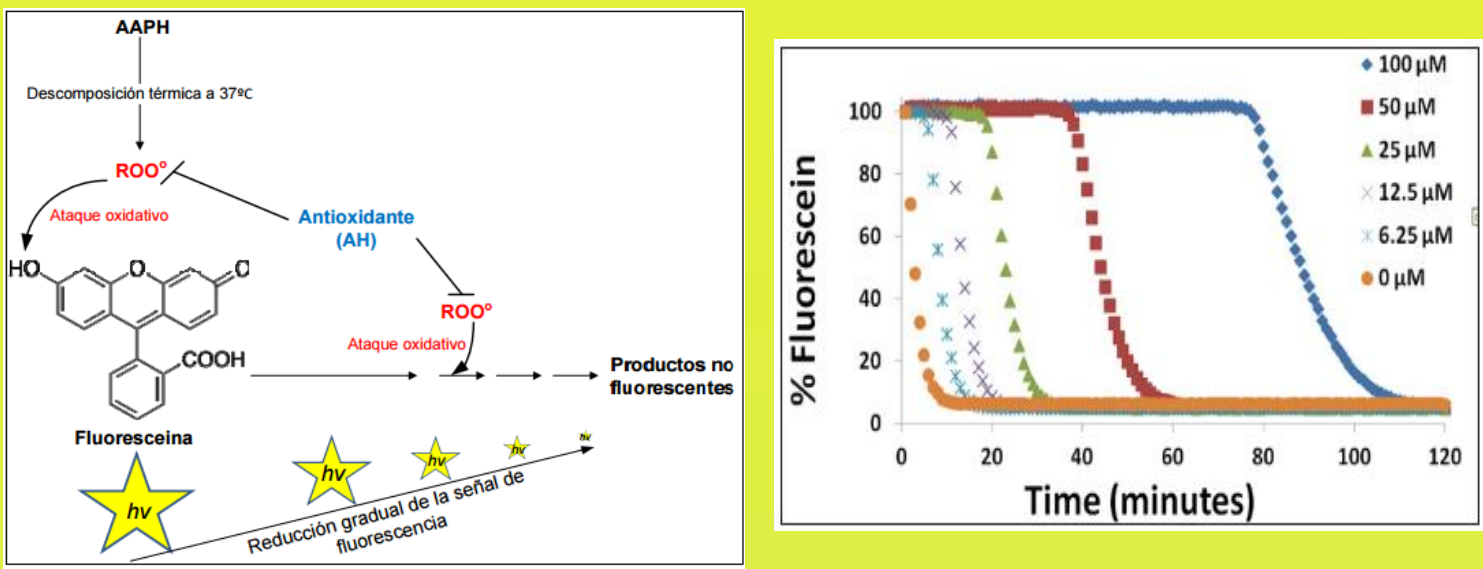
% de inhibición y la duración de T de inh.

Equivalentes de Trolox (Antiox. ref.)

  Especificidad

Tiempo aprox. 70 min

Antiox. proteicos (albumina) y no proteicos (vit., ac.  rico y bilirrubina) y otros como melatonina, dopamina o flavonoides.



TRAP (Total Radical Trapping Power o Poder de Captación de Radicales Totales)

Oxígeno consumido (Fluorim trico)

Azoderivado (AAPH o ABAP)

Equivalentes de Trolox

  Antiox.   Oxígeno => Periodo oxidación se inh. compara Trolox.

Simple, fiable y permite un manejo rápido de las muestras

Antiox. ascorbato, alfa- tocoferol, ac.  rico y con grupos SH.

Posibles errores: sinérgica antioxidantes (ascórbico y los derivados SH)   pérdida de capacidad antioxidante que si se midieran por separado.



B) Métodos para medir la capacidad antioxidante específica en muestras biológicas

B.1) Sistemas enzimáticos

Determinación de la actividad superoxido dismutasa (SOD) eritrocitaria

Espectrofotométrico

Inh. de la formación de un cromógeno = % inh . del enz.

A partir de la xantina y xantina oxidasa (XO) se forman radicales superóxido, los cuales reaccionan con compuesto para formar un complejo coloreado.

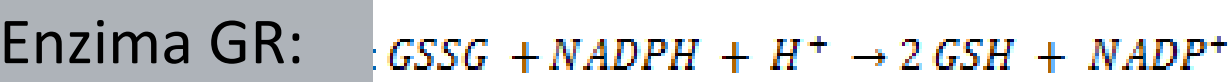
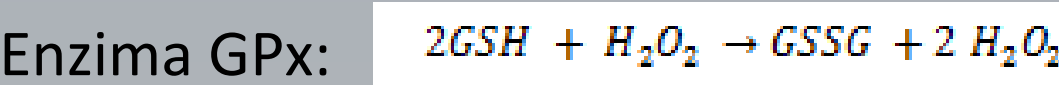
La enz. SOD elimina este superoxido   Inh. de la formación de un cromógeno

Unidades/mg de proteína por min.

Glutatión peroxidasa GPX eritrocitaria

Espectrofotométrico

  Abs. Metodo indirecto



  Abs. por   NADPH respecto al blanco

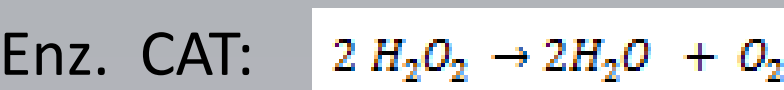
Glutatión reductasa GR

Espectrofotométrico

NADPH   NADP

Determinación de la actividad catalasa (CAT)

Espectrofotométrico



  Abs. por   H O  respecto al blanco

B.2) Sistemas no enzimáticos

Glutatión (GSH + GSSG)

1  Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

2  Abs . UV, detección por fluorescencia, detección electroquímica o espectrometría de masas

Vitamina C o Ascórbico

HPLC

Precaución, fácilmente oxidable.   Acidificación plasma

Vitamina E o Tocoferol

1  Cromatografía líquida de fase reversa (HPLC -RPC)

2  Espectrofotometría

BIBLIOGRAFIA

- FERNANDEZ-PACHON, María Soledad, VILLAFIO, D., TRONCOSO, A. M., & García-Parrilla, M. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. Archivos latinoamericanos de nutrición, 2006, vol. 56, no 2, p. 110-122.
- KARADAG, Ayse, Ozcelik, B., & Saner, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. Food analytical methods, 2009, vol. 2, no 1, p. 41-60
- MORAG N, Ángela Casado. Termalismo y actividad física. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), 2007.
- PACHECO, Elio Mujica. Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante plasmática en la insuficiencia venosa. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2011.

TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity o Capacidad Antioxidante de Equivalentes de Trolox)

Espectrofotométrica

  Antiox.   Inh. Abs. por ABTS  (Cromóforo azul-verdoso)   coloración     Abs.

% inhibición formación ABTS  por antiox. en un punto de tiempo fijo.

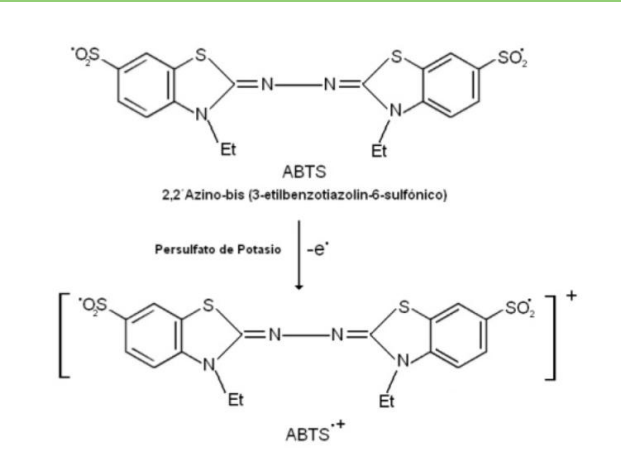
Equivalentes de Trolox.

Reactivos caros (~9 veces mayor ORAC)

Tiempo aprox. entre 3 y 6 min

Antiox. liposolubles e hidrosolubles

Principalmente fitoquímicos (flavon ides)



FRAP ((Ferric ion Reducing Antioxidant Power o Capacidad Antioxidante para Reducir el ion F rrico)

Espectrofotométrico

Complejo cromógeno, TPTZ

Incoloro   azul verdoso

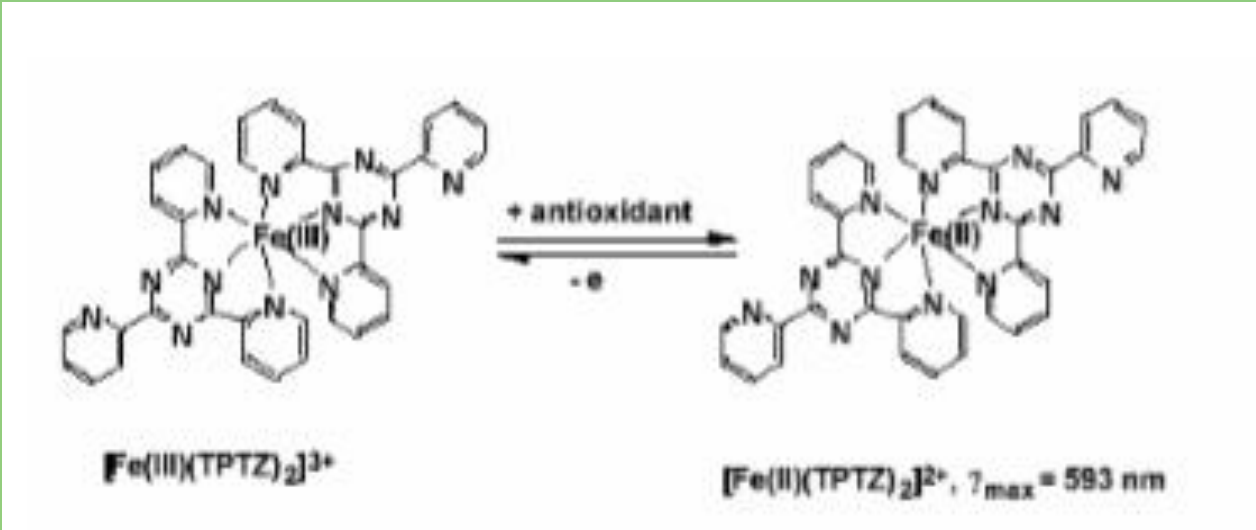
Equivalentes de Fe 2+/L

  Abs. de forma lineal

Simple y relativamente barato

Antiox. no enz. (vit. C (ac. ascórbico) y otros (ac.  rico).

No sirve antiox. grupos SH (glutatión, ac. lip ico y algunos aminoácidos,), ya que no reducen de forma efectiva el hierro.



CONCLUSIONES

RL

- Exógenos
-   Graso (hamburguesas y aderezadas)
- Procesados (embutidos)
- Fritos o asados
- Con conservantes
- Exceso de alcohol
- Elementos químicos(med., pinturas, humo del tabaco, herbicidas, metales pesados o radiaciones ionizantes)

- Endógenas
- Reacciones metabólicas
- Sistema inmunitario

Como hemos visto en este estudio existen varios métodos para determinar cómo los organismos vivos pueden actuar frente a estas sustancias y como medir su capacidad antioxidante mediante los métodos más relevantes. Esto no quiere decir, que en la actualidad existan otros métodos, incluso varios métodos para determinar lo mismo, por ejemplo, la misma enzima.

A medida que la investigación aumenta se siguen buscando nuevos métodos o mejorando los ya existentes más específicos, selectivos y fiables, evitando así los posibles errores de medición que aun podemos encontrar, para así poder cuantificar de manera más exacta cual es la capacidad antioxidante real.



- PÉREZ JIMÉNEZ, Jara. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes efectos de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parametros de riesgo cardiovascular en humanos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2007.
- PRIOR, Ronald L.; Cao, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods 1. Free Radical Biology and Medicine, 1999, vol. 27, no 11, p. 1173-1181.
- SÁNCHEZ-VALLE, Vicente; Méndez-Sánchez, N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. Revista de Investigación Médica Sur Mexico, 2013, vol. 20, no 3, p. 161-168.
- SHAHIDI, Fereidoon, Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. Journal of functional foods, 2015, vol. 18, p. 757-781.
- VASCONCELOS, Sandra Mary Lima, Goulart, M. O. F., Moura, J. B. D. F., Manfredini, V., Benfato, M. D. S., & Kubota, L. T. Espécies reativas de oxig nio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de d no oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. Química Nova, São Paulo. Vol. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VENEREO GUTIÉRREZ, Justo R. Da o oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana de medicina militar, 2002, vol. 31, no 2, p. 126-133.